

**Cytoplasmatic expression in E. coli of antibodies, antibody fragments and fusions thereof**  
***Cytoplasmatische Expression von Antikörpern, Antikörperfragmenten und Antikörperfragment-Fusionsmolekülen in E. coli***  
***Expression cytoplasmique dans E. coli des anticorps, fragments d'anticorps et fusions de ceux-ci***

**Assignee:**

HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, (200264), Postfach 80 03 20, 65926 Frankfurt am Main, (DE), (Proprietor designated states: all)

**Inventor:**

Opper, Martin, Dr., Stumpelstal 25, D-35041 Marburg, (DE)  
Bosslet, Klaus, Dr., An der Haustatt 64, D-35037 Marburg, (DE)  
Czech, Jorg, Dr., Kreutzacker 2a, D-35041 Marburg, (DE)

**Legal Representative:**

Fischer, Hans-Jurgen, Dr. et al (70771), Aventis Pharma Deutschland GmbH, Patent- und Lizenzabteilung, 65926 Frankfurt am Main, (DE)

**Patent**

Country Code/Number	Kind	Date
EP 737747	A2	October 16, 1996 (Basic)
EP 737747	A3	March 28, 2001
EP 737747	B1	June 11, 2003

**Application**

Country Code/Number	Date
EP 96103913	March 13, 1996

**Priority Application Number (Country Code, Number, Date): DE 19513676 (950411)**

**Designated States: AT; BE; CH; DE; DK; ES; FR; GB; GR; IE; IT; LI; LU; NL; PT; SE**

**International Patent Class: C12N-015/13; C12N-015/62; C12N-009/24**

**Cited Patents (EP B): EP 501215 A; EP 590530 A**

**Cited References (EP B):**

- K. BOSSLET ET AL.: "Molecular and functional characterisation of a fusion protein suited for tumour specific prodrug activation." BRITISH JOURNAL OF CANCER, Bd. 65, Nr. 2, Februar 1992 (1992-02), Seiten 234-238, XP002092531 Basingstoke, Grossbritannien
- A. PLUCKTHUN ET AL.: "Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in Escherichia coli." METHODS IN ENZYMOLOGY, Bd. 178, 1989, Seiten 497-515, XP002024991 New York, NY, VSA
- M. RODRIGUES ET AL.: "Development of a humanized disulfide-stabilized anti-p185HER2 Fv-

beta-lactamase fusion protein for activation of a cephalosporin doxorubici prodrug." CANCER RESEARCH, Bd. 55, Nr. 1, 1. Januar 1995 (1995-01-01), Seiten 63-70, XP002159150 Baltimore, MD, VSA

- H. HAISMA ET AL.: "A monoclonal antibody-beta-glucuronidase conjugate as activator of the prodrug epirubicin-glucuronide for specific treatment of cancer." BRITISH JOURNAL OF CANCER, Bd. 66, Nr. 3, September 1992 (1992-09), Seiten 474-478, XP000882039 Basingstoke, Grossbritannien
- A. DERMAN ET AL.: "Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of Escherichia coli." SCIENCE, Bd. 262, Nr. 5140, 10. Dezember 1993 (1993-12-10), Seiten 1744-1747, XP002159151 Washington, DC, VSA
- M. HE ET AL.: "Functional expression of a dingle-chain anti-progesterone antibody fragment in the cytoplasm of a mutant Escherichia coli." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 23, Nr. 19, 11. Oktober 1995 (1995-10-11), Seiten 4009-4010, XP002159152 Oxford, Grossbritannien
- K. PROBA ET AL.: "Functional antibody single-chain fragments from the cytoplasm of Escherichia coli: influence of thioredoxin reductase (TrxB)." GENE, Bd. 159, Nr. 2, 4. Juli 1995 (1995-07-04), Seiten 203-207, XP004042207 Amsterdam, die Niederlande

**Abstract:** EP 737747 A2 (Translated)

Prodn. of recombinant antibody (Ab), Ab fragment or Ab/enzyme fusion protein

Prodn. of recombinant antibodies (Ab), Ab fragments or Ab fragment/enzyme fusion proteins, where the enzyme is a cytoplasmic mammalian or E. coli enzyme, is effected using a thioredoxinreductase deficient E. coli strain, the expression prods. being isolated from the cytoplasm. Also claimed are: (1) Ab fragment/enzyme fusion protein in which the enzyme is E. coli (beta)-glucuronidase; and (2) gene encoding the fusion protein of (1).



(19)

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11) EP 0 737 747 A2

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:  
16.10.1996 Patentblatt 1996/42

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: C12N 15/13, C12N 15/62,  
C12N 9/24

(21) Anmeldenummer: 96103913.8

(22) Anmeldetag: 13.03.1996

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL PT  
SE  
(30) Priorität: 11.04.1995 DE 19513676  
(71) Anmelder: BEHRINGWERKE AG  
35001 Marburg (DE)

(72) Erfinder:  
• Opper, Martin, Dr.  
D-35041 Marburg (DE)  
• Bosslet, Klaus, Dr.  
D-35037 Marburg (DE)  
• Czech, Jörg, Dr.  
D-35041 Marburg (DE)

### (54) Cytoplasmatische Expression von Antikörpern, Antikörperfragmenten und Antikörperfragment-Fusionsmolekülen in E. coli

(57) Die Erfindung betrifft die cytoplasmatische Expression von Antikörpern, Antikörperfragmenten und Antikörperfragmentfusionsmolekülen in E. coli. Insbesondere Antikörperfragmentfusionsmoleküle mit einem gegen Tumore gerichteten Antikörperteil und einem eine untoxische "Prodrug" in die toxische "Drug" spaltenden Enzymteil sind so unter Beibehaltung der jeweiligen funktionellen Eigenschaften günstig herstellbar.

EP 0 737 747 A2

**Beschreibung**

Die Erfindung betrifft die cytoplasmatische Expression von Antikörpern, Antikörperfragmenten und Antikörperfragmentfusionsmolekülen in E. coli. Insbesondere Antikörperfragmentfusionsmoleküle mit einem gegen Tumore gerichteten Antikörperteil und einem eine untoxische "Prodrug" in die toxische "Drug" spaltenden Enzymteil sind so unter Beibehaltung der jeweiligen funktionellen Eigenschaften günstig herstellbar.

Die Expression von Antikörpern oder Antikörperfragmenten unter Erhalt ihrer antigenbindenden Eigenschaft gelang bisher in E.coli nur unter Verwendung von Signalsequenzen, die den Transport ins Periplasma steuern. Die Expressionsausbeuten bewegen sich bei der periplasmatischen E.coli Expression im Bereich von wenigen µg/l Kulturmedium (Ayala et al., Bio Techniques 13, S. 790 - 799, 1992). Außerdem sind oft Rückfaltungsversuche notwendig, um funktionell aktive Antikörperfragmente (Fab) oder Antigenbinderegionen (sFv) zu gewinnen.

Es bestand daher weiterhin das Bedürfnis, bessere Methoden zur Expression von funktionell aktiven Antikörpern bzw. Antikörperfragmenten zu entwickeln. In Zusammenhang mit dem ADEPT Konzept (Bagshawe, Br.J. Cancer, Vol. 60, pp 275 - 281, 1989) sollten diese verbesserten Methoden auch auf Antikörperfragmentenzymfusionsmoleküle, speziell auf Fusionsproteine mit cytoplasmatischen Säuger- oder E.coli-Enzymen wie z. B. die E.coli β-Glucuronidase anwendbar sein.

Die β-Glucuronidase von Escherichia coli ist biochemisch und genetisch gut untersucht. Das Gen (*uid A*) wurde von Jefferson et al. (PNAS Vol. 83, pp 8447 - 8451, 1986) kloniert und als Reportergen für heterologe Kontrollregionen eingesetzt.

β-Glucuronidase (β-D-Glucuronid Glucuronosohydrolase, E.C. 3.2.1.31) stellt eine saure Hydrolase dar, die die Spaltung von β-Glucuroniden katalysiert. Da die Säuger-Glucuronidasen intensiv untersucht wurden, sind vielerlei Substanzen für histologische, spektrophotometrische sowie fluorometrische Analysen verfügbar. Neue, zusätzliche Bedeutung hat dieses Enzym in der Verwendung für Fusionsproteine zur gezielten Tumortherapie erlangt. Dabei wird die humane Glucuronidase in Form eines Fusionsproteins mit Antikörpern/Antikörperfragmenten bzw. Antigenbinderegionen verwendet (Bosslet et al., Br.J. Cancer, 65, 234 - 238, 1992). Alternativ zum humanen Enzym ist auch der Einsatz der homologen E.coli β-Glucuronidase möglich. Unter anderem hat die E.coli-β-Glucuronidase den Vorteil, daß ihre katalytische Aktivität bei physiologischem pH signifikant höher ist als die der humanen β-Glucuronidase.

Antikörperfragmentenzymfusionsmoleküle konnten bisher nur periplasmatisch in E.coli exprimiert werden. Der dabei verwendete Enzymanteil besteht daher stets aus periplasmatischen E.coli-Enzymen wie z. B. β-Lactamase (Goshorn et al., Canc.Res. 53, 2123 - 2117, 1993).

Die Expression eines Antikörperfragmentenzymfusionsmoleküls unter Verwendung eines cytoplasmatischen E.coli Enzyms wie der β-Glucuronidase war in funktionell aktivem Zustand, d. h. unter Beibehaltung von enzymatischer Aktivität - wie auch Antigenbindungsfähigkeit des Antikörperteils - bisher nicht möglich. Die funktionell aktive Expression von den meisten Antikörpern bzw. Antikörperfragmentmolekülen erfordert in der Regel definierte Signalsequenzen zum Export der exprimierten Moleküle via endoplasmatischem Retikulum in das Kulturmedium (Animalzellen und Hefen) bzw. in das Periplasma (E.coli). Nur im endoplasmatischen Retikulum bzw. im Periplasma herrschen die notwendigen oxidativen Bedingungen zur Ausbildung der für die funktionelle Aktivität wichtigen Disulfidbrücken. Außerdem ist der sekretorische Syntheseweg oft für die korrekte dreidimensionale Faltung des exprimierten Proteins entscheidend.

Ein bezüglich Thioredoxinreduktase defizienter E.coli Stamm, z. B. der Stamm AD 494, kann Disulfidbrücken im Cytoplasma ausbilden und erlaubt so die intrazelluläre Expression von natürlicherweise sekretorischen Enzymen, wie z. B. alkalischer Phosphatase (Derman et al, Science, Vol. 262, 1744 - 1747, 1993).

Es wurde nun gefunden, daß sich ein Fab-Molekül wie z. B. des MAK BW 431/26 funktionell aktiv, d. h. unter Beibehaltung der Antigenbindungseigenschaften in einem bezüglich Thioredoxinreduktase defizienten E.coli Stamm cytoplasmatisch exprimieren läßt, ebenso auch kompletter Antikörper.

Überraschenderweise konnte überdies ein Antikörperfragmentenzymfusionsmolekül bestehend aus beispielsweise dem cytoplasmatischen, nicht disulfidverbrückten E.coli-Enzym β-Glucuronidase und z. B. dem Fab BW 431/26, der seinerseits intramolekulare Cystinbrücken zur korrekten Faltung benötigt (Fab BW 431/26-E.coli-β-Glucuronidase) im Cytoplasma exprimiert und daraus in funktioneller Form isoliert werden. Dabei war das exprimierte Molekül löslich und keine Rückfaltungsversuche notwendig. Damit eröffnen sich neue Möglichkeiten zur wirtschaftlichen Produktion von Antikörpern, Antikörperfragmenten und Antikörperfragmentenzymfusionsmolekülen für die therapeutische und diagnostische Anwendung.

Die Erfindung betrifft daher Verfahren zur gentechnischen Expression von Antikörpern, Antikörperfragmenten oder Antikörperfragmentfusionsmolekülen mit cytoplasmatischen Säuger- oder E.coli-Enzymen als Fusionspartner mittels thioredoxinreduktase-defizienter E.coli Stämme und nachfolgender Isolierung der Expressionsprodukte aus dem Cytoplasma. Antikörperfragmente sind dabei bevorzugt Fab-Fragmente oder auch Antigenbinderegionen (sFv, Plückthun und Skerra, Meth. Enzymol. 178, S. 497 - 515, 1991). Besonders bevorzugt sind schließlich Antikörperfragmentenzymfusionsproteine mit cytoplasmatischen E.coli-Enzymen als Fusionspartner, ganz bevorzugt mit E.coli-β-Glucuronidase als Fusionspartner.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

**Beispiel 1**

5 Konstruktion eines dicistronischen Expressionsvektors ohne Signalsequenzen

A) Klonierung der E.coli- $\beta$ -Glucuronidase aus E.coli RR1:

Mit den Primern E.c. $\beta$  Gluc. for und E.c. $\beta$  Gluc. back wurde die für E.coli  $\beta$ -Glucuronidase kodierende DNA-Sequenz aus dem E.coli Stamm RR1 mittels PCR amplifiziert und über Xba I/Hind III in den Vektor KS kloniert (Fig. 1).

B) Klonierung von VH/CH1 und Linker(Verbindungsstück) MAK BW 431/26 vor E.coli- $\beta$ -Glucuronidase:

Mit den Primern Fab HC for und Fab HC back wurde aus einem vorhandenen cDNA-Konstrukt HC-hum- $\beta$ -Glucuronidase mittels PCR die variable Domäne VH und die konstante Domäne CH1 amplifiziert und über Xba I/Eco RI in den Vektor KS kloniert (Fig. 2). Nach Verifizierung der DNA-Sequenz wurde ein über Xba I/Nco I Verdau gewonnenes DNA-Fragment in den mit XbaI/Ncol geschnittenen Vektor aus Klonierungsschritt A ligiert (Fig. 3).

C) Klonierung des Fab BW 431/26 E.coli- $\beta$ -Glucuronidase in pTrc 99:

Zu der in dem Expressionsvektor pTrc99 (Amann et al, Gene 69, 301, 1988) vorhandenen leichten Kette des MAK BW 431/26 wurde ein Xba I/Hind III Fragment ligiert, das die korrespondierende schwere Kette fusioniert an die E.coli- $\beta$ -Glucuronidase enthält (Fig. 4). Das entstandene Konstrukt hat die Struktur: Promotor (trc) - Shine Dalgarno Sequenz (SD) - VK/CK MAK BW 431/26 - SD - VH/CH1 MAK BW 431/26 - E.coli- $\beta$ -Gluc. - Transskriptions-Terminationssignal (Fig. 5).

25 **Beispiel 2**

Expression in AD 494

Übernacht-Kulturen des in Beispiel 1 beschriebenen pTrc dicistr. Fab-E.coli- $\beta$ -Gluc. in AD 494 wurden 1:10 verdünnt und bei 25 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 inkubiert. Nach Induktion mit 1 mM IPTG für 19 - 22 Stunden wurden die Zellen 1-1,5 Stunden auf Eis inkubiert. Nach Pelletierung und Resuspendierung der Zellen in 10 ml PBS, pH 7,2 pro Liter Kulturvolumen in der French Press bei 1000 - 1500 Psi aufgebrochen. Der Zellaufbruch wurde bei 20.000 rpm im SS-34 Rotor geklärt und der Überstand für die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

35 **Beispiel 3**

Affinitätschromatographische Reinigung des Fusionsmoleküls

Der über 2  $\mu$ m Filter geklärte Zellaufbruchsüberstand wurde über die Bindung des Fusionsproteins an einen antiidiotypischen monoklonalen Antikörper (BW 2064/34) affinitätschromatographisch gereinigt (6 mg MAK/ml CnBr-aktivierter Sepharose 4B). Das an die Affinitätssäule gebundene Fusionsprotein wurde über pH-Wert Shift (pH 7,2 - pH 5,0) eluiert. Mittels Ultrafiltration erfolgte anschließend die Konzentrierung des Eluats (Filtron Macrosep, Omega NMWL:30 KD). Im SDS-PAGE wurden Zellaufbruchsüberstand, Durchfluß, ankonzentriertes Eluat und Filtrat der Ultrafiltration analysiert. Die bei etwa 97 KD auftretende Bande entspricht molekulargewichtsmäßig dem erwarteten Fusionsprotein aus dem Schwerkettenanteil des Antikörpers und der E.coli Glucuronidase. Die bei etwa 70 KD auftretende Bande repräsentiert endogene  $\beta$ -Glucuronidase, die über die Bildung von Heterotetrameren (s. u.) zwischen exprimierter schwerer Kette/ $\beta$ - Glucuronidase und endogener  $\beta$ -Glucuronidase bei der Affinitäts-chromatographie mitgereinigt worden ist.

50 **Beispiel 4**

TSK-3000 Gelchromatographie

In der TSK 3000 Gelchromatographie wurde das native Molekül untersucht und das Molekulargewicht mit 450 KD bestimmt. Da die Glucuronidase im nativen Zustand ein Tetramer bildet, entspricht das beobachtete dem theoretisch zu erwartenden Molekulargewicht. Im folgenden wird dieser Schritt im einzelnen beschrieben.

Von einem über Antidiotyp affinitätsgereinigtem Fusionsprotein wurden 400 ng in 25  $\mu$ l auf einer TSK Gel G 3000 SW XL Säule (TOSO HAAS, Best. Nr. 3.5WxN3211, 7,8 mm x 300 mm) in einem geeigneten Laufmittel (PBS, pH 7,2, 5 g/l Maltose, 4,2 g/l Arginin) mit einer Flußrate von 0,5 ml/min. chromatographiert. Die Merck Hitachi HPLC-Anlage (L-

400 UV-Detektor, L-6210 Intelligent pump, D-2500 Chromato-Integrator) wurde mit etwa 20 bar betrieben, die optische Dichte des Eluats wurde bei 280 nm bestimmt und mittels eines LKB 2111 Multisac Fraktionssammlers 0,5 ml Fraktionen gesammelt, die anschließend im Spezifitätsenzymaktivitätstest (Beispiel 5) einer Analyse unterworfen wurden. Das Experiment ist in Fig. 6 dargestellt. Basierend auf den mittels Pfeilen markierten Molekulargewichtspositionen von Eichproteinen kann gefolgt werden, daß das funktionell aktive Fab-E.coli- $\beta$ -Glucuronidase Fusionsprotein ein Molekulargewicht von etwa 450 KD besitzt.

### Beispiel 5

#### 10 Nachweis der Antigenbindungseigenschaften und der enzymatischen Aktivität

Die Fähigkeit des Fab-E.coli- $\beta$ -Glucuronidase Fusionsproteins spezifisch an das durch den MAK 431/26 definierte Epitop auf CEA (Carcino Embryonales Antigen) zu binden und gleichzeitig die enzymatische Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase auszuüben, wurde in einem Spezifitäts-Enzymaktivitätstest gezeigt (EP-A-0 501 215 A2, Beispiel J). Der Test bestimmt die Freisetzung von 4-Methylumbelliferon aus 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -Glucuronid durch den  $\beta$ -Glucuronidaseanteil des Fusionsproteins, nachdem das Fusionsprotein über den Fab-Anteil an das Antigen gebunden ist. Die ermittelten Fluoreszenzwerte werden als relative Fluoreszenzeinheiten (FE) angegeben (Tab. 1). Der Test zeigt eine signifikante Methylumbelliferon Freisetzung durch das Fusionsprotein bei den mit CEA beschichteten Platten.

Als Kontrolle dienen mit PEM (polymorphic epithelial mucin) beschichteten Platten. Das Fluoreszenzsignal war dort stets kleiner 30 FE.

Tab.1

	1 : 2	1: 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1: 128	1: 256
FE Zellaufbruchsüberstand 1:3	8183	8149	7531	6631	4560	2509	1019	421,9
FE Durchfluß 1:1	6548	5231	3222	1477	525,2	214	86,19	46,29
FE Eluat pH 5,0 1:3	7782	7571	6360	4239	1983	815,7	302	113,9
FE Eluat pH 5,0 Ultrakonzent. 1:10	7904	8106	8036	7153	5802	3618	1651	665,7
FE Eluat pH 5,0 Ultrafiltrat 1:1	74,65	172,7	90,23	52,30	38,84	25,79	23,51	19,39

35

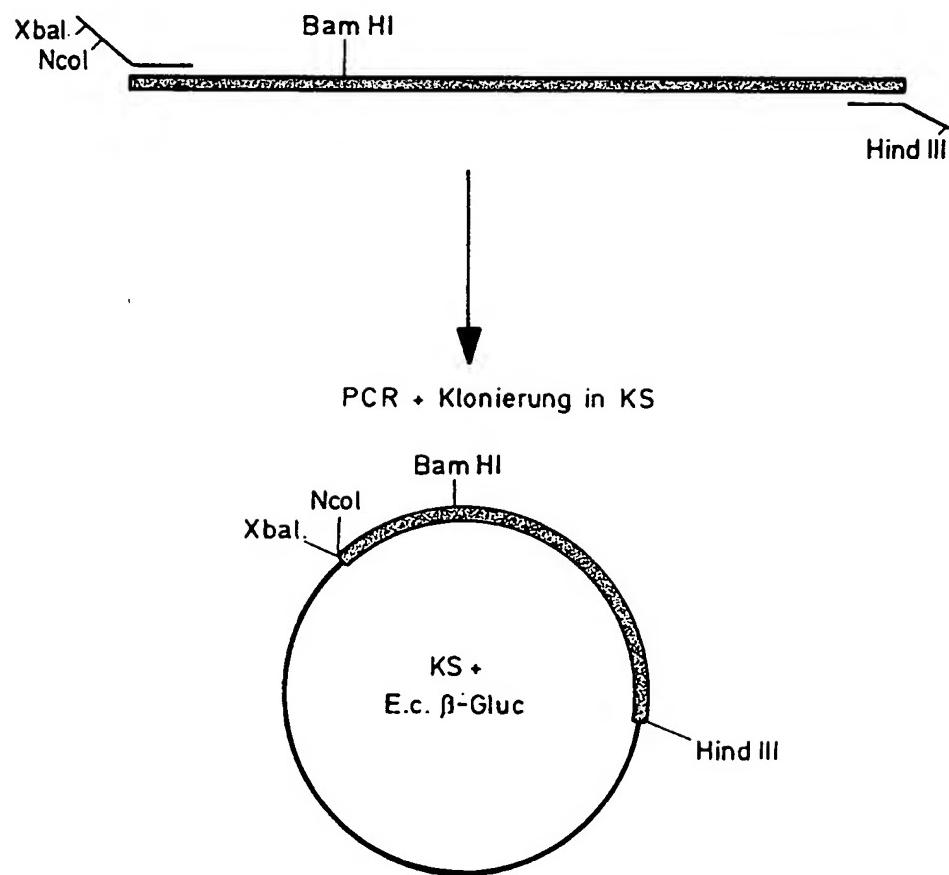
### Patentansprüche

- Verfahren zur gentechnischen Expression von Antikörpern, Antikörperfragmenten oder Antikörperfragmentenzymfusionsmolekülen mit cytoplasmatischen Säuger- oder E.coli Enzymen als Fusionspartner, dadurch gekennzeichnet, daß Thioredoxinreduktase defizierte E.coli Stämme eingesetzt werden und die Expressionsprodukte aus dem Cytoplasma isoliert werden.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Fab-Fragmente oder Antigenbinderegionen (sFv) exprimiert werden.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Antikörperfragmentenzymfusionsmolekül im Antikörperteil gegen Tumorzellen gerichtet ist und der Enzymteil in der Lage ist, untoxische "Prodrugs" in toxische "Drugs" zu spalten.
- Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörperteil humanisiert wurde und der Enzymteil ein humanes cytoplasmatisches Enzym ist.
- Antikörperfragmentenzymfusionsprotein, dadurch gekennzeichnet, daß E.coli- $\beta$ -Glucuronidase Fusionspartner ist.
- Gen codierend für ein Fusionsprotein nach Anspruch 5.

## FIG.1

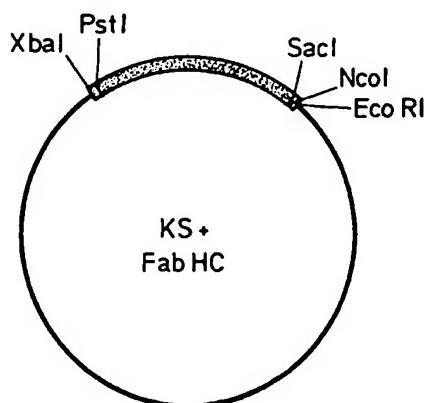
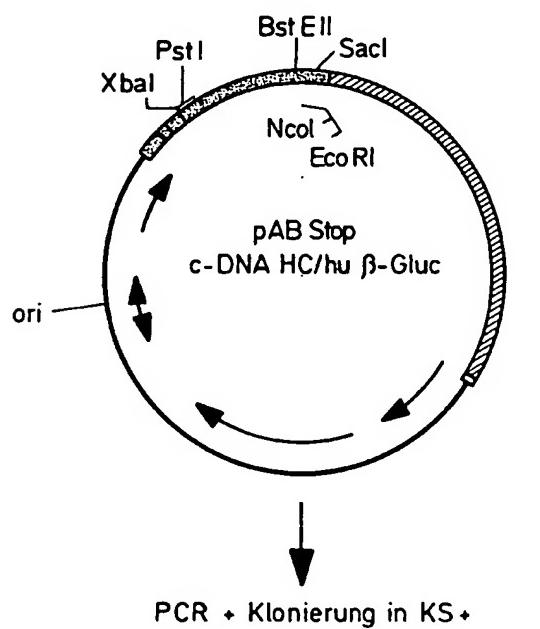
E.c.  $\beta$ -Gluc for: 5' AAG CTT TCA TTG TTT GCC TCC CTG CTG CGG 3'

E.c.  $\beta$ -Gluc back: 5' ICT AGA CCA TGG TAC GTC CTG TAC AAA CCC CA 3'

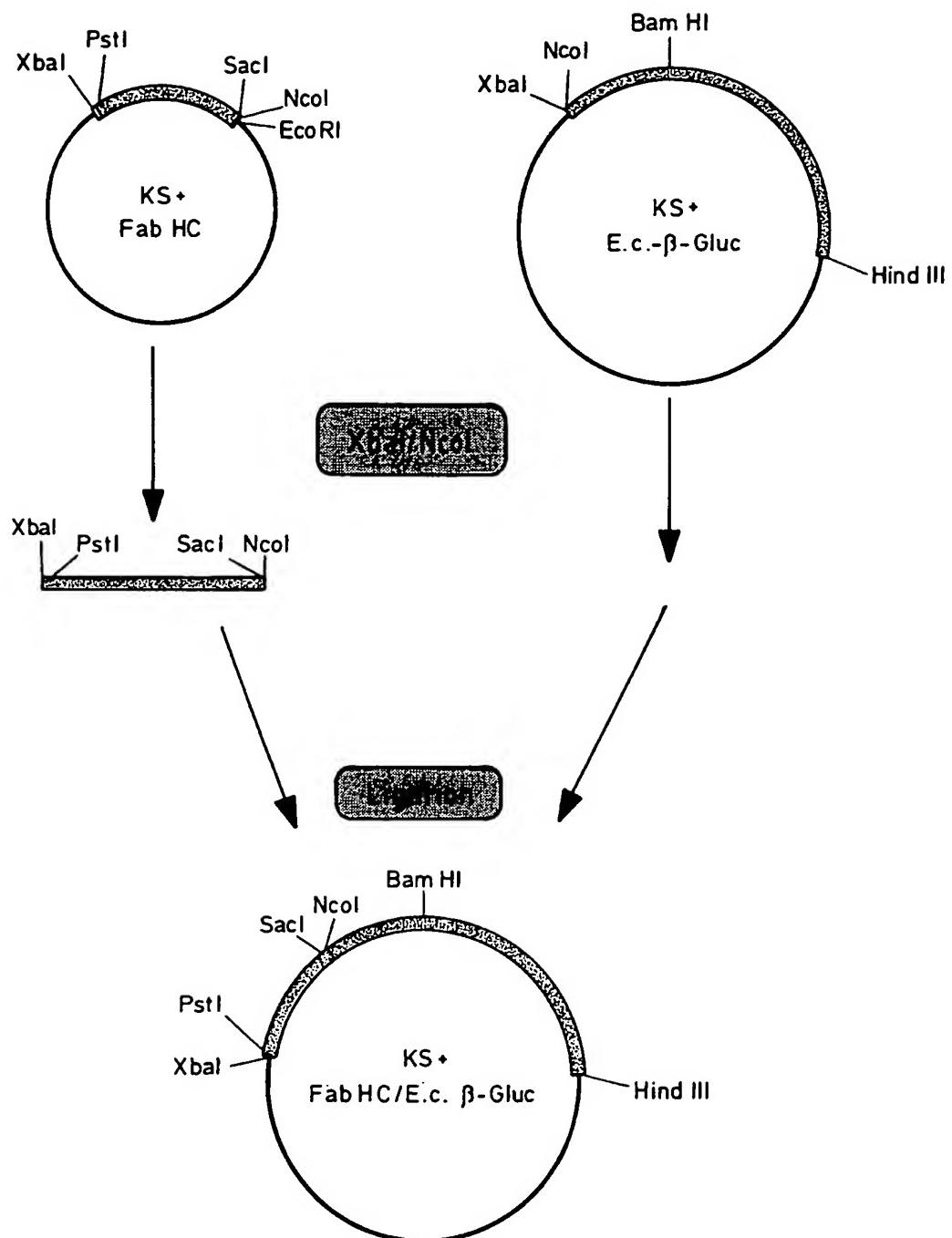


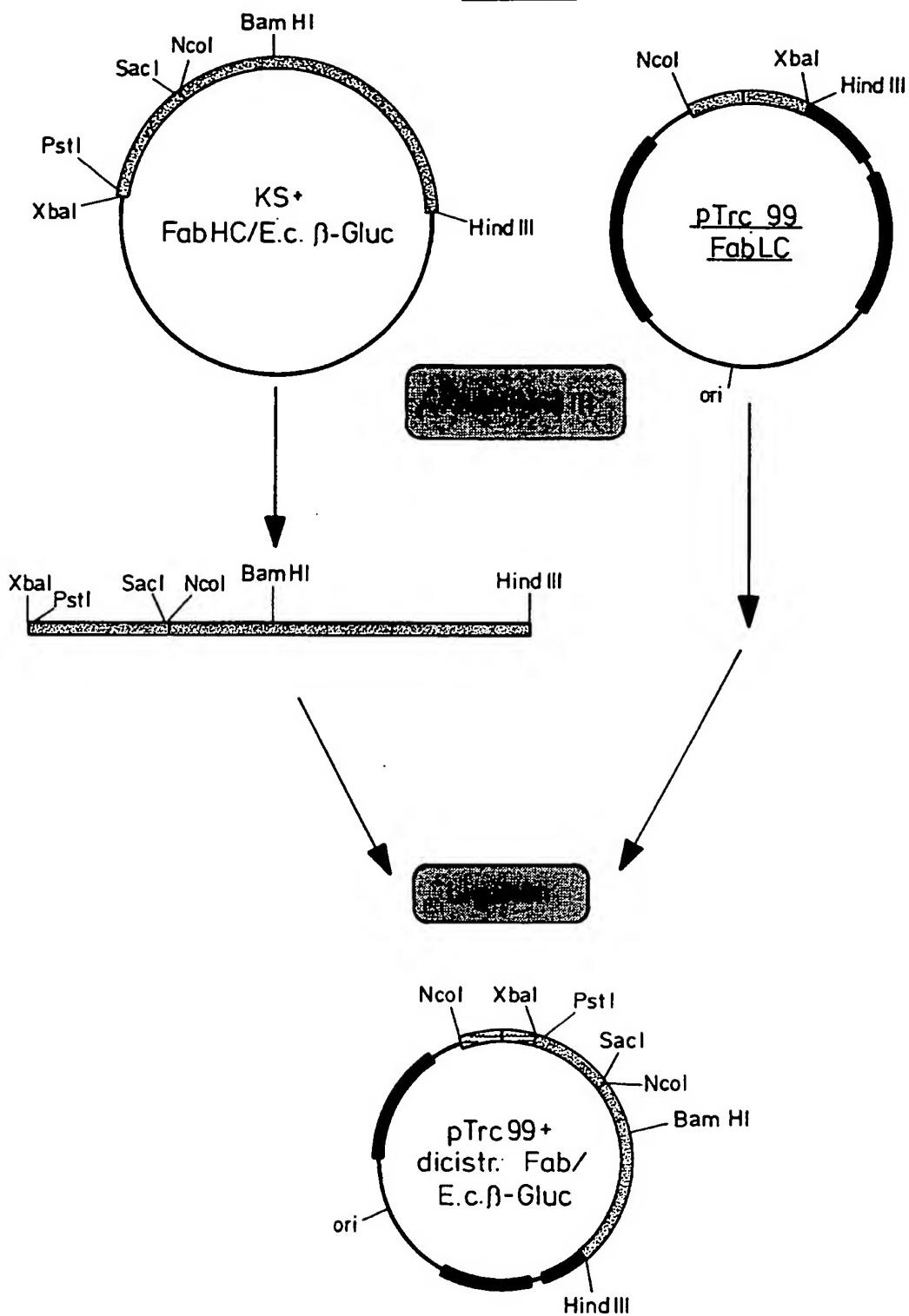
## FIG. 2

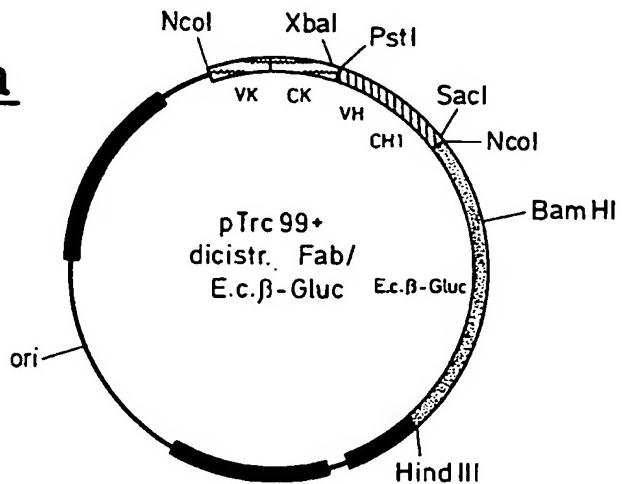
Fab HC back: 5' ICT AGA TAA CGA GGG CAA AAA ATG GAG GTC CAA CTG CAG N2b  
 SD → V H  
 GAG AGC 3'



**FIG.3**



**FIG.4**

431/26 hum dicistr. Fab / E.c. $\beta$ -Glucuronidase in pTrc 99FIG.5a

NcoI  
1 CC ATG GAC ATC CAG ATG ACC CAG ACC CCA AGC AGC CTG AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA  
1>Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg N5

60 GTG ACC ATC ACC TGT AGT ACC AGC TCG AGT GTA AGT TAC ATG CAC TGG TAC CAG CAG CAG AAG  
20>Val Thr Ile Thr Cys Ser Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys

120 CCA GGT AAG CCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC ACC ACA TCC AAC CTG CCT TCT GGT GTG CCA VK  
40>Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

180 AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC ACC CTC CAG  
60>Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln

240 CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC TAC TGC CAT CAG TGG AGT AGT TAT CCC ACG TTC GGC CAA  
80>Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Thr Phe Gly Gln

300 GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGT ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA  
100>Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro.

360 TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT  
120>Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Lou Asn Asn Phe Tyr

420 CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG CK  
140>Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

480 GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACC  
160>Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Lou Thr

540 CTG ACC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TCC GAA GTC ACC CAT CAG GGC  
180>Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly

XbaI  
600 CTG ACC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGC CCA GGA GAG TGT TAG TCTAGATAACGAGGGAAA  
200>Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys ...

PstI  
664 AA ATG GAG GTC CAA CTG CAG GAG AGC GGT CCA GGT CTT GTG AGA CCT AGC CAG ACC CTG  
1>Met Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu

FIG.5b

723 ACC CTG ACC TCC ACC GTG TCT GGC TTC ACC ATC ACC AGT GGT TAT ACC TGG CAC TGG GTG  
20> Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Gly Tyr Ser Trp His Trp Val

783 ACA CAG CCA CCT GGA CGA CGT CTT GAG TCG ATT GCA TAC ATA CAG TAC ACT GGT ATC ACT  
40> Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Gln Tyr Ser Gly Ile Thr

VH

843 AAC TAC AAC CCC TCT CTC AAA AGT AGA GTG ACA ATG CTG GTA GAC ACC ACC AAC CAG  
60> Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln

903 TTC ACC CTG AGA CTC ACC ACC GTG ACA GGC GGC GAC ACC GCG GTC TAT TAT TGT GCA AGA  
80> Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

963 GAA GAC TAT CAT TAC CAC TCG TAC TTC GAT GTC TCG CGT CAA GGC ACC CTC GTC ACA GTC  
100> Glu Asp Tyr Asp Tyr His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val

1023 ACA GTC TCC TCA GCT TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCG CCC TGC TCC AGG  
120> Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1083 ACC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GGC CTG GGC TCC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCC  
140> Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro

CH1

1143 GTG ACC GTG TCG TGG AAC TCA GGC CCC CTG ACC ACC GGC GTG CAC ACC TTC CGG GCT GTC  
160> Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

1203 CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC ACC ACC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG  
180> Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu

1263 GGC ACC CAG ACC TAC ACC TCG AAC GTG AAT CAC AAG CCC ACC AAC ACC AAG GTG GAC AAC  
200> Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
link

SacI

NcoI

1323 AGA GTT GAG CTC CGT TCT CGT TCT CGT TCC ATG GTA CGT CCT GTC GAA ACC CCA ACC CCT  
220> Arg Val Glu Leu Gly Ser Gly Ser Met Val Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr Arg

1383 GAA ATC AAA AAA CTC GAC GGC CTG TGG CCA TTC AGT CTG CAT CCC GAA AAC TGT CGA ATT  
240> Glu Ile Lys Lys Leu Asp Gly Leu Trp Ala Phe Ser Leu Asp Arg Glu Asn Cys Gly Ile

1443 GAT CAG CGT TGG TCG GAA ACC GCG TTA CAA GAA ACC CGG GCA ATT GCT GTG CCA GGC ACT  
260> Asp Gln Arg Trp Trp Glu Ser Ala Leu Gln Glu Ser Arg Ala Ile Ala Val Pro Gly Ser

1503 TTT AAC GAT CAG TTC GCC GAT GCA GAT ATT CGT AAT TAT GCG CCC AAC GTC GTC TCC TAT CAC  
280> Phe Asn Asp Gln Phe Ala Asp Ala Asp Ile Arg Asn Tyr Ala Gly Asn Val Trp Tyr Gln

E.c. β-Gluc

1563 CCC GAA GTC TTT ATA CCG AAA CGT TCG GCA GGC CAG CGT ATC GTG CTG CGT TTC GAT CCC  
300> Arg Glu Val Phe Ile Pro Lys Gly Trp Ala Gly Gln Arg Ile Val Leu Arg Phe Asp Ala

1623 GTC ACT CAT TAC GCC AAA GTG TCG GTC AAT AAT CAG GAA GTG ATG GAG CAT CAG GGC GGC  
320> Val Thr His Tyr Gly Lys Val Trp Val Asn Asn Gln Glu Val Met Glu His Gln Gly Ile

1683 TAT ACG CCA TTT GAA GCG GAT GTC ACG CCG TAT GTT ATT GCG CGG AAA AGT GTC CGT ATC  
340> Tyr Thr Pro Phe Glu Ala Asp Val Thr Pro Tyr Val Ile Ala Gly Lys Ser Val Arg Ile

1743 ACC GTT TGT GTG AAC AAC GAA CTG AAC TGG CAG ACT ATC CCG CGG GGA ATG GTG ATT ACC  
360> Thr Val Cys Val Asn Asn Glu Leu Asn Trp Gln Thr Ile Pro Pro Gly Met Val Ile Thr

BamHI

1803 GAC GAA AAC GGC AAG AAA AAG CAG TCT TAC TTC CAT AAT TTC TTT AAC TAT GCG GGG AAT  
380> Asp Glu Asn Gly Lys Lys Gln Ser Tyr Phe His Asn Phe Phe Asn Tyr Ala Gly Ile

1863 CAT CGC ACC GTC ATG CTC TAC ACC ACC CGG AAC ACC TGG GTG GAC GAT ATC ACC GTG GTG  
400> His Arg Ser Val Met Leu Tyr Thr Thr Phe Asn Thr Trp Val Asp Asp Ile Thr Val Val

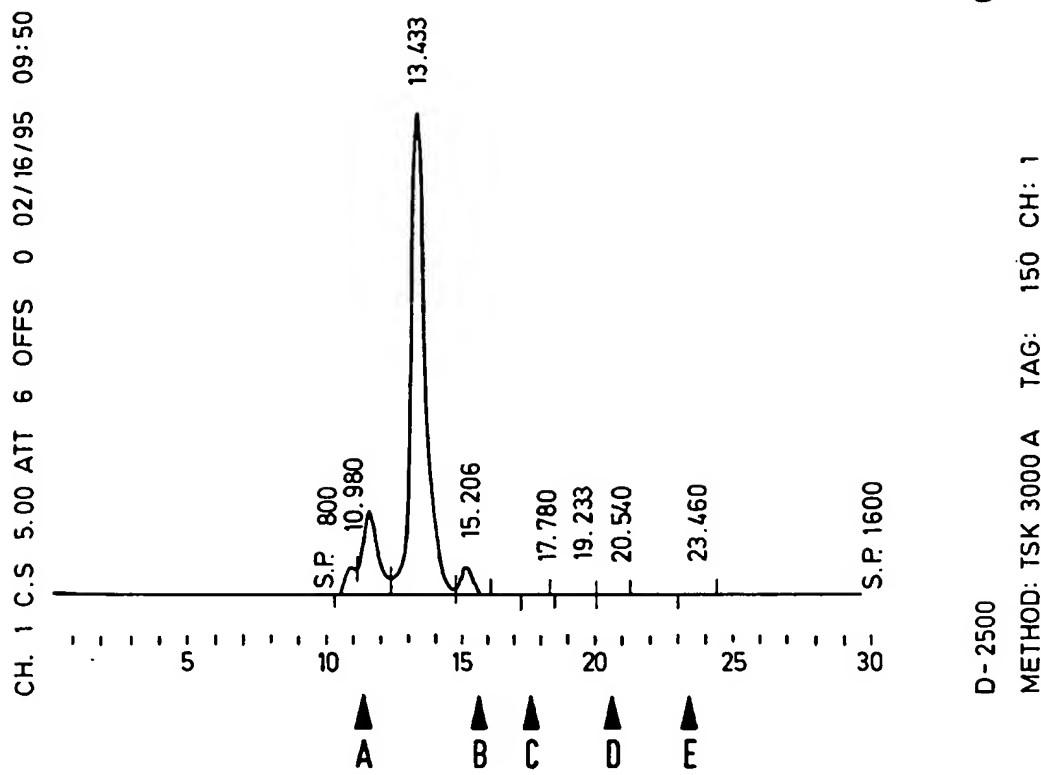
1923 ACG CAT GTC CGG CAA GAC CAC AAC CGG TCT GTC GAC TGG CAG GTG GTG GGC AAT CGT  
420> Thr His Val Ala Gln Asp Cys Asn His Ala Ser Val Asp Trp Gln Val Val Ala Asn Gly

FIG. 5c

1983 GAT GTC AGC GTT GAA CTG CGT GAT GCG GAT CAA CAG GTG GTT GCA ACT GGA CAA CCC ACT  
 440>Asp Val Ser Val Glu Leu Arg Asp Ala Asp Gln Gln Val Val Ala Thr Gly Gln Gly Thr  
  
 2043 AGC GGG ACT TTG CAA GTG GTG ATT CGG CAC CTC TCG CAA CGG GGT GAA GGT TAT CTC TAT  
 460>Ser Gly Thr Leu Gln Val Val Asn Pro His Leu Trp Gln Pro Gly Glu Gly Tyr Leu Tyr  
  
 2103 GAA CTG TGC GTC ACA GCC AAA AGC CAG ACA GAG TGT GAT ATC TAC CGG CTT CGC GTC GGC  
 480>Glu Leu Cys Val Thr Ala Lys Ser Gln Thr Glu Cys Asp Ile Tyr Pro Leu Arg Val Gly  
  
 2163 ATC CGG TCA GTG GCA GTG AAG GGC GAA CAG TTC CTG ATT AAC CAC AAA CCG TTC TAC TTT  
 500>Ile Arg Ser Val Ala Val Lys Gly Glu Gln Phe Leu Ile Asn His Lys Pro Phe Tyr Phe  
  
 2223 ACT GCC TTT CGT CGT CAT GAA GAT GCG GAC TTA CGT GGC AAA GGA TTC GAT AAC GTG CTG  
 520>Thr Gly Phe Gly Arg His Glu Asp Ala Asp Leu Arg Gly Lys Gly Phe Asp Asn Val Leu  
  
 2283 ATG GTG CAC GAC CAC GCA TTA ATG GAC TGG ATT GGG GCC AAC TCC TAC CGT ACC TCG CAT  
 540>Met Val His Asp His Ala Leu Met Asp Trp Ile Gly Ala Asn Ser Tyr Arg Thr Ser His  
  
 2343 TAC CCT TAC GCT GAA GAG ATG CTC GAC TGG GCA GAT GAA CAT GGC ATC GTG GTG ATT GAT  
 560>Tyr Pro Tyr Ala Glu Glu Met Leu Asp Trp Ala Asp Glu His Gly Ile Val Val Ile Asp  
  
 2403 GAA ACT GCT GTC GCC TTT AAC CTC TCT TTA CGC ATT GGT TTC GAA GCG GGC AAC AAG  
 580>Glu Thr Ala Ala Val Gly Phe Asn Leu Ser Leu Gly Ile Gly Phe Glu Ala Gly Asn Lys  
  
 2463 CCG AAA GAA CTG TAC ACC GAA GAG GCA GTC AAC GGG GAA ACT CAG CAA GCG CAC TTA CAG  
 600>Pro Lys Glu Leu Tyr Ser Glu Glu Ala Val Asn Gly Glu Thr Gln Gln Ala His Leu Gln  
  
 2523 GCG ATT AAA GAG CTG ATA CGG CGT GAC AAA AAC CAC CCA AGC GTG GTG ATG TGG AGT ATT  
 620>Ala Ile Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asp Lys Asn His Pro Ser Val Val Met Trp Ser Ile  
  
 2583 GCC AAC GAA CGG GAT ACC CGT CGG CAA CGT GCA CGG GAA TAT TTC CGG CCA CTG CGG GAA  
 640>Ala Asn Glu Pro Asp Thr Arg Pro Gln Gly Ala Arg Glu Tyr Phe Ala Pro Leu Ala Glu  
  
 2643 GCA ACC CGT AAA CTC GAC CCG ACC CGT CCG ATC ACC TGC GTC AAT GTA ATG TTC TGC GAC  
 660>Ala Thr Arg Lys Leu Asp Pro Thr Arg Pro Ile Thr Cys Val Asn Val Met Phe Cys Asp  
  
 2703 GCT CAC ACC GAT ACC ATC ACC GAT CTC TTT GAT GTG CTG TGC CTG AAC CGT TAT TAC CGA  
 680>Ala His Thr Asp Thr Ile Ser Asp Leu Phe Asp Val Leu Cys Leu Asn Arg Tyr Tyr Gly  
  
 2763 TGG TAT GTC CAA AGC CGC GAT TTG GAA ACC GCA GAG AAG GTA CTG GAA AAA GAA CTT CTG  
 700>Trp Tyr Val Gln Ser Gly Asp Leu Glu Thr Ala Glu Lys Val Leu Glu Lys Glu Leu Leu  
  
 2823 GCC TGG CAG GAG AAA CTG CAT CAG CCG ATT ATC ATC ACC GAA TAC GCA CGG GTG GAT ACC TTA  
 720>Ala Trp Gln Glu Lys Leu His Gln Pro Ile Ile Thr Glu Tyr Gly Val Asp Thr Leu  
  
 2883 GCC GGG CTG CAC TCA ATG TAC ACC GAC ATG TGG AGT GAA GAG TAT CAG TGT GCA TGG CTG  
 740>Ala Gly Leu His Ser Met Tyr Thr Asp Met Trp Ser Glu Glu Tyr Gln Cys Ala Trp Leu  
  
 2943 GAT ATG TAT CAC CGC GTC TTT GAT CGC GTC ACC GCC GTC GTC GGT GAA CAG GCA GTC TGG AAT  
 760>Asp Met Tyr His Arg Val Phe Asp Arg Val Ser Ala Val Val Gly Glu Gln Val Trp Asn  
  
 3003 TTC GCC GAT TTT GCG ACC TCG CAA GCC ATA TTG CGC GTT GGC GGT AAC AAG AAA GGG ATC  
 780>Phe Ala Asp Phe Ala Thr Ser Gln Gly Ile Leu Arg Val Gly Glu Asn Lys Lys Gly Ile  
  
 3063 TTC ACT CGC GAC CGC AAA CCG AAG TCG CGC GCT TTT CTG CTG CAA AAA CGC TGG ACT GGC  
 800>Phe Thr Arg Asp Arg Lys Pro Lys Ser Ala Ala Phe Leu Leu Gln Lys Arg Trp Thr Gly  
  
 3123 ATG AAC TTC CGT GAA AAA CCG CAG CAG GGA GGC AAA CAA TGA AGCTT  
 820>Met Asn Phe Gly Glu Lys Pro Gln Gln Gly Lys Gln ...

HindIII

FIG. 6



TSK - 3000 Gelchromatographie. Retentionszeit des Fusionsproteins 13.4 min.

- A: Thyroglobulin 670.000 KD
- B: Gamma - Globulin 158.000 KD
- C: Ovalbumin 44.000 KD
- D: Myoglobin 17.000 KD
- E: Vitamin B-12 1.350 KD